

U.S. Patent Application No. 09/486,094 by Freyssinet et al., filed July 17, 2000, (document 34) is a 371 National Stage of International PCT Application PCT/FR98/01814, which was published in French as WIPO Publication No. WO 99/09189 (document 28) and 09486,094 represents an English version of PCT/FR98/01814.

PCT

ORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIETE INTELLECTUELLE  
Bureau international



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIEE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets <sup>6</sup> : <b>C12N 15/82, C07K 14/435, C12N 15/12, A01H 1/00</b>		A1	(11) Numéro de publication internationale: <b>WO 99/09189</b> (43) Date de publication internationale: <b>25 février 1999 (25.02.99)</b>
(21) Numéro de la demande internationale: <b>PCT/FR98/01814</b>		(81) Etats désignés: AL, AU, BA, BB, BG, BR, CA, CN, CU, CZ, EE, GE, HR, HU, ID, IL, IS, JP, KP, KR, LK, LR, LT, LV, MG, MK, MN, MX, NO, NZ, PL, RO, SG, SI, SK, SL, TR, TT, UA, US, UZ, VN, YU, brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).	
(22) Date de dépôt international: <b>18 août 1998 (18.08.98)</b>			
(30) Données relatives à la priorité: <b>97/10632 20 août 1997 (20.08.97)</b>		FR	
(71) Déposant ( <i>pour tous les Etats désignés sauf US</i> ): <b>RHONE-POULENC AGRO [FR/FR]; 14-20, rue Pierre Baizet, F-69009 Lyon (FR).</b>		Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale.</i> <i>Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si des modifications sont reçues.</i>	
(72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants ( <i>US seulement</i> ): <b>FREYSSINET, Georges [FR/FR]; 21, rue de Nervieux, F-69450 Saint Cyr au Mont d'Or (FR). DEROSE, Richard [US/FR]; 216, rue de Saint Cyr, F-69009 Lyon (FR). HOFFMANN, Jules [FR/FR]; 5, rue Closener, F-67000 Strasbourg (FR).</b>			
(74) Mandataire: <b>TETAZ, Franck; Rhône-Poulenc Agro, Boîte postale 9163, F-69263 Lyon Cedex 09 (FR).</b>			
(54) Titre: <b>GENE CODING FOR ANDROCTONINE, VECTOR CONTAINING SAME AND TRANSFORMED DISEASE-RESISTANT PLANTS OBTAINED</b>			
(54) Titre: <b>GENE CODANT POUR L'ANDROCTONINE, VECTEUR LE CONTENANT ET PLANTES TRANSFORMÉES OBTENUES RÉSISTANTES AUX MALADIES</b>			
(57) Abstract			
<p>The invention concerns a DNA sequence coding for androctonine, a vector containing same for transforming a host organism and the transformation method. More particularly the invention concerns the transformation of plant cells and plants, the drosomycine produced by the transformed plants providing them with resistance to diseases, in particular those of fungal origin.</p>			
(57) Abrégé			
<p>La présente invention a pour objet une séquence d'ADN codant pour l'androctonine, un vecteur la contenant pour la transformation d'un organisme hôte et le procédé de transformation. L'invention concerne plus particulièrement la transformation des cellules végétales et des plantes, la drosomycine produite par les plantes transformées leur conférant une résistance aux maladies, en particulier d'origine fongique.</p>			

***UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION***

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lithuanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	ML	Mali	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	MN	Mongolie	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MR	Mauritanie	UA	Ukraine
BR	Brésil	IL	Israël	MW	Malawi	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MX	Mexique	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	NE	Niger	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NL	Pays-Bas	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norvège	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NZ	Nouvelle-Zélande	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	PL	Pologne		
CM	Cameroon	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CN	Chine	KZ	Kazakhstan	RO	Roumanie		
CU	Cuba	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
CZ	République tchèque	LI	Liechtenstein	SD	Soudan		
DE	Allemagne	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
DK	Danemark	LR	Libéria	SG	Singapour		
EE	Estonie						

Gène codant pour l'androctonine, vecteur le contenant et plantes transformées obtenues  
résistantes aux maladies

5 La présente invention a pour objet une séquence d'ADN codant pour l'androctonine, un vecteur la contenant pour la transformation d'un organisme hôte et le procédé de transformation dudit organisme.

L'invention concerne plus particulièrement la transformation des cellules végétales et des plantes, l'androctonine produite par les plantes transformées leur conférant une 10 résistance aux maladies, en particulier d'origine fongique.

Il existe aujourd'hui un besoin grandissant de rendre les plantes résistantes contre les maladies notamment fongiques afin de diminuer, voire d'éviter, d'avoir recours à des traitements avec des produits de protection antifongiques, en vue de protéger l'environnement. Un moyen d'augmenter cette résistance aux maladies consiste à 15 transformer les plantes de manière qu'elles produisent des substances à même d'assurer leur défense contre ces maladies.

On connaît différentes substances d'origine naturelle, en particulier des peptides, présentant des propriétés bactéricides ou fongicides, notamment contre les champignons responsables des maladies des plantes. Toutefois, le problème consiste à trouver de telles 20 substances qui pourront non seulement être produites par des plantes transformées, mais encore conserver leurs propriétés bactéricides ou fongicides et les conférer aux dites plantes. Au sens de la présente invention, on entend par bactéricide ou fongicide tant les propriétés bactéricides ou fongicides proprement dites que les propriétés bactériostatiques ou fongistatiques.

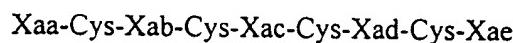
25 Les androctonines sont des peptides produits par les scorpions, en particulier de l'espèce *Androctonus australis*. Une androctonine et sa préparation par synthèse chimique est décrite par Ehret-Sabatier & coll., de même que ses propriétés antifongiques et antibactériennes *in vitro*.

On a maintenant identifié les gènes des androctonines, et on a également trouvé 30 qu'ils pouvaient être insérés dans un organisme hôte, en particulier une plante, pour exprimer une androctonine tant pour la préparation et l'isolation de cette androctonine que pour conférer au dit organisme hôte des propriétés de résistance aux maladies fongiques et aux maladies d'origine bactérienne, apportant une solution particulièrement avantageuse au

problème énoncé ci-dessus.

L'invention a donc d'abord pour objet un fragment d'acide nucléique codant pour une androctonine, un gène chimère comprenant ledit fragment codant pour une androctonine ainsi que des éléments de régulation en position 5' et 3' hétérologues pouvant fonctionner dans un organisme hôte, en particulier dans les plantes et un vecteur pour la transformation des organismes hôtes contenant ce gène chimère, et l'organisme hôte transformé. Elle concerne aussi une cellule végétale transformée contenant au moins un fragment d'acide nucléique codant pour une androctonine et une plante résistante aux maladies contenant la dite cellule, en particulier régénérée à partir de cette cellule. Elle concerne enfin un procédé de culture des plantes transformées selon l'invention.

Par androctonine, on entend selon l'invention tout peptide pouvant être produit et isolé des scorpions, en particulier de l'espèce *Androctonus australis* ces peptides comprenant au moins 20 acides aminé, de préférence au moins 25, et 4 résidus cystéine formant entre eux des ponts disulfure. De manière avantageuse, l'androctonine comprend essentiellement la séquence peptidique de formule générale (I) suivante :



(I)

dans laquelle

Xaa représente un reste peptidique comprenant au moins 1 acide aminé,

Xab représente un reste peptidique de 5 acides aminés,

Xac représente un reste peptidique de 5 acides aminés,

Xad représente un reste peptidique de 3 acides aminés, et

Xae représente un reste peptidique comprenant au moins 1 acide aminé.

De manière avantageuse, Xab et/ou Xad et/ou Xae comprennent au moins un acide aminé basique, de préférence 1. Par acide aminé basique, on entend selon l'invention les acides aminés choisis parmi la lysine, l'asparagine ou l'homoasparagine.

De manière préférentielle,

Xaa représente la séquence peptidique Xaa'-Val, dans laquelle Xaa' représente NH<sub>2</sub> ou un reste peptidique comprenant au moins 1 acide aminé, et/ou

Xab représente la séquence peptidique -Arg-Xab'-Ile, dans laquelle Xab' représente un reste peptidique de 3 acides aminés, et/ou

Xac représente la séquence peptidique -Arg-Xac'-Gly-, dans laquelle Xac' représente un reste peptidique de 3 acides aminés, et/ou

Xad représente la séquence peptidique -Tyr-Xad'-Lys, dans laquelle Xad' représente un reste peptidique de 1 acide aminé, et/ou

Xae représente la séquence peptidique -Thr-Xae', dans laquelle Xae' représente COOH ou un reste peptidique comprenant au moins 1 acide aminé.

5 De manière plus préférentielle,

Xaa' représente la séquence peptidique Arg-Ser-, et/ou

Xab' représente la séquence peptidique -Gln-Ile-Lys-, et/ou

Xac' représente la séquence peptidique -Arg-Arg-Gly-, et/ou

Xad' représente le reste peptidique -Tyr-, et/ou

10 Xae' représente la séquence peptidique -Asn-Arg-Pro-Tyr.

Selon un mode préférentiel de réalisation de l'invention, l'androctonine est représentée par la séquence peptidique de 25 acides aminés décrite l'identificateur de séquence n° 1 (SEQ ID NO 1) et les séquences peptidiques homologues.

Par séquences peptidiques homologues, on entend toute séquence équivalente  
15 comprenant au moins 65 % d'homologie avec la séquence représentée par l'identificateur de séquence n° 1, étant entendu que les 4 résidus cystéine et le nombre d'acides aminés les séparant restent identiques, certains acides aminés étant remplacés par des acides aminés différents mais équivalents sur des sites n'induisant pas de modification substantielle de l'activité antifongique ou antibactérienne de la dite  
20 séquence homologue. De préférence, les séquences homologues comprennent au moins 75 % d'homologie, plus préférentiellement au moins 85 % d'homologie, encore plus préférentiellement 90 % d'homologie.

Le résidu NH<sub>2</sub>-terminal de l'androctonine peut présenter une modification post traductionnelle, par exemple une acétylation, alors que le résidu C-terminal peut  
25 présenter une modification post traductionnelle, par exemple une amidation.

Par séquence peptidique comprenant essentiellement la séquence peptidique de formule générale (I), on entend non seulement les séquences définies ci-dessus, mais également de telles séquences comprenant à l'une ou l'autre de leurs extrémités, ou les deux, des résidus peptidiques nécessaires à leur expression et ciblage dans un organisme  
30 hôte, en particulier une cellule végétale ou une plante.

Il s'agit en particulier d'un peptide de fusion « peptide-androctonine » ou « androctonine-peptide », avantageusement « peptide-androctonine », dont la coupure par les systèmes enzymatiques des cellules végétales permet la libération de l'androctonine,

définie ci-dessus. Le peptide fusionné à l'androctonine peut être un peptide signal ou un peptide de transit qui permet de contrôler et d'orienter la production de l'androctonine de manière spécifique dans une partie de l'organisme hôte, en particulier de la cellule végétale ou de la plante, comme par exemple le cytoplasme, la membrane cellulaire, ou 5 dans le cas des plantes dans un type particulier de compartiments cellulaires ou de tissus ou dans la matrice extracellulaire.

Selon un mode de réalisation, le peptide de transit peut être un signal d'adressage chloroplastique ou mitochondrial, lequel est ensuite clivé dans les chloroplastes ou les mitochondries.

10 Selon un autre mode de réalisation de l'invention, le peptide signal peut être un signal N-terminal ou « prépeptide », éventuellement en association avec un signal responsable de la rétention de la protéine dans le réticulum endoplasmique, ou un peptide d'adressage vacuolaire ou « propeptide ». Le réticulum endoplasmique est le lieu où sont pris en charge par la « machinerie cellulaire » des opérations de maturation de la protéine 15 produite, comme par exemple le clivage du peptide signal.

Les peptides de transit peuvent être soit simples, soit doubles, et dans ce cas éventuellement séparés par une séquence intermédiaire, c'est à dire comprenant, dans le sens de la transcription, une séquence codant pour un peptide de transit d'un gène végétal codant pour une enzyme à localisation plastidiale, une partie de séquence de la partie 20 mature N-terminale d'un gène végétal codant pour une enzyme à localisation plastidiale, puis une séquence codant pour un second peptide de transit d'un gène végétal codant pour une enzyme à localisation plastidiale, tels que décrit dans la demande EP 0 508 909.

Comme peptide de transit utile selon l'invention, on peut citer en particulier le peptide signal du gène PR-1 $\alpha$  du tabac (WO 95/19443), représenté avec sa séquence 25 codante par l'identificateur de séquence n° 2 (SEQ ID NO 2) et fusionné à l'androctonine par l'identificateur de séquence n° 3 (SEQ ID NO 3), en particulier correspondant à la protéine de fusion correspondant aux bases 12 à 176 de cette séquence, en particulier lorsque l'androctonine est produite par des cellules végétales ou des plantes, ou le précurseur du facteur Mat  $\alpha$ 1 lorsque l'androctonine est produite dans des levures..

30 La présente invention concerne donc d'abord un fragment d'acide nucléique, en particulier d'ADN, codant pour l'androctonine définie ci-dessus. Il peut s'agir selon l'invention d'un fragment isolé de *Androctonus australis*, ou encore un fragment dérivé, adapté pour l'expression de l'androctonine dans l'organisme hôte où le peptide sera

exprimé. le fragment d'acide nucléique peut être obtenu selon les méthodes standards d'isolation et de purification, ou encore par synthèse selon les techniques usuelles d'hybridations successives d'oligonucléotides synthétiques. Ces techniques sont notamment décrites par Ausubel & coll.

5 Selon la présente invention, on entend par « fragment d'acide nucléique » une séquence nucléotidique pouvant être de type ADN ou ARN, de préférence de type ADN, en particulier ADNc, notamment double brin.

10 Selon un mode de réalisation de l'invention, le fragment d'acide nucléique codant pour l'androctonine est la séquence d'ADN décrite par l'identificateur de séquence n° 1 (SEQ ID NO 1), une séquence homologue ou une séquence complémentaire de ladite séquence, plus particulièrement la partie codante de cette SEQ ID NO1, correspondant aux bases 1 à 75.

15 Par « homologue », on entend selon l'invention un fragment d'acide nucléique présentant une ou plusieurs modifications de séquence par rapport à la séquence nucléotidique décrite par l'identificateur de séquence n° 1 et codant pour l'androctonine. Ces modifications peuvent être obtenues selon les techniques usuelles de mutation, ou encore en choisissant les oligonucléotides synthétiques employés dans la préparation de ladite séquence par hybridation. Au regard des multiples combinaisons d'acides nucléiques pouvant conduire à l'expression d'un même acide aminé, les différences entre 20 la séquence de référence décrite par l'identificateur de séquence n° 1 et l'homologue peuvent être importantes, d'autant plus qu'il s'agit d'un fragment d'ADN de taille inférieure à 100 acides nucléiques, réalisable par synthèse. De manière avantageuse, le degré d'homologie sera d'au moins 70 % par rapport à la séquence de référence, de préférence d'au moins 80 %, plus préférentiellement d'au moins 90 %. Ces modifications 25 sont généralement neutres, c'est à dire qu'elles n'affectent pas la séquence primaire de l'androctonine résultante.

La présente invention concerne également un gène chimère (ou cassette d'expression) comprenant une séquence codante ainsi que des éléments de régulation en position 5' et 3' hétérologues pouvant fonctionner dans un organisme hôte, en particulier 30 les cellules végétales ou les plantes, liés de manière fonctionnelle à ladite séquence codante, ladite séquence codante comprenant au moins un fragment d'ADN codant pour l'androctonine tel que défini ci-dessus (y compris le peptide de fusion « peptide-androctonine » ou « androctonine-peptide »).

Par organisme hôte, on entend tout organisme mono ou pluricellulaire, inférieur ou supérieur, dans lequel le gène chimère selon l'invention peut être introduit, pour la production d'androctonine. Il s'agit en particulier de bactéries, par exemple *E. coli*, de levures, en particulier des genres *Saccharomyces* ou *Kluyveromyces*, *Pichia*, de champignons, en particulier *Aspergillus*, d'un bacylovirus, ou de préférence des cellules végétales et des plantes.

Par "cellule végétale", on entend selon l'invention toute cellule issue d'une plante et pouvant constituer des tissus indifférenciés tels que des cals, des tissus différenciés tels que des embryons, des parties de plantes, des plantes ou des semences.

On entend par "plante" selon l'invention, tout organisme multicellulaire différencié capable de photosynthèse, en particulier monocotylédones ou dicotylédones, plus particulièrement des plantes de culture destinées ou non à l'alimentation animale ou humaine, comme le maïs, le blé, le colza, le soja, le riz, la canne à sucre, la betterave, le tabac, le coton, etc.

Les éléments de régulation nécessaires à l'expression du fragment d'ADN codant pour l'androctonine sont bien connus de l'homme du métier en fonction de l'organisme hôte. Ils comprennent notamment des séquences promotrices, des activateurs de transcription, des peptides de transit, des séquences terminatrices, y compris des codons start et stop. Les moyens et méthodes pour identifier et sélectionner les éléments de régulation sont bien connus de l'homme du métier.

Pour la transformation des microorganismes comme les levures ou les bactéries, les éléments de régulation sont bien connus de l'homme du métier, et comprennent notamment des séquences promotrices, des activateurs de transcription, des peptides de transit, des séquences terminatrices et des codons start et stop.

Pour diriger l'expression et la sécrétion du peptide dans le milieu de culture de la levure, un fragment d'ADN codant l'héliomycine est intégré dans un vecteur navette qui comprend les éléments suivants :

- des marqueurs permettant de sélectionner les transformants,
- une séquence nucléique permettant la réPLICATION (origine de réPLICATION) du plasmide dans la levure,
- une séquence nucléique permettant la réPLICATION (origine de réPLICATION) du plasmide dans *E. coli*,
- une cassette d'expression constituée

- (1) d'une séquence de régulation promotrice,
- (2) d'une séquence codant pour un peptide signal (ou prépeptide) en association avec un peptide d'adressage (ou propeptide),
- (3) d'une séquence de régulation terminatrice ou de polyadénylation.

5 Ces éléments ont été décrits dans plusieurs publications dont Reichhart *et al.*, 1992, Invert. Reprod. Dev., 21, pp 15-24 et Michaut *et al.*, 1996, FEBS Letters, 395, pp 6-10 .

De manière préférentielle, on transforme des levures de l'espèce *S. cerevisiae* avec le plasmide d'expression par la méthode à l'acétate de lithium (Ito *et al.*, 1993, J. Bacteriol, 175, pp 163-168).

10 L'invention concerne plus particulièrement la transformation des plantes. Comme séquence de régulation promotrice dans les plantes, on peut utiliser toute séquence promotrice d'un gène s'exprimant naturellement dans les plantes en particulier un promoteur d'origine bactérienne, virale ou végétale tel que, par exemple, celui d'un gène de la petite sous-unité de ribulose-biscarboxylase/oxygénase (RuBisCO) ou d'un gène de 15 virus de plante tel que, par exemple, celui de la mosaïque du choux fleur (CAMV 19S ou 35S), ou un promoteur inductible par les pathogènes comme le PR-la du tabac, tout promoteur convenable connu pouvant être utilisé. De préférence on a recours à une séquence de régulation promotrice qui favorise la surexpression de la séquence codante de manière constitutive ou induite par l'attaque d'un pathogène, tel que par exemple, celle 20 comprenant au moins un promoteur d'histone tel que décrit dans la demande EP 0 507 698.

Selon l'invention, on peut également utiliser, en association avec la séquence de régulation promotrice, d'autres séquences de régulation, qui sont situées entre le promoteur et la séquence codante, telles que des activateurs de transcription ("enhancer"), comme par exemple l'activateur de translation du virus de la mosaïque du tabac (TMV) décrit dans la 25 demande WO 87/07644, ou du virus etch du tabac (TEV) décrit par Carrington & Freed.

Comme séquence de régulation terminatrice ou de polyadénylation, on peut utiliser toute séquence correspondante d'origine bactérienne, comme par exemple le terminateur nos d'*Agrobacterium tumefaciens*, ou encore d'origine végétale, comme par exemple un terminateur d'histone tel que décrit dans la demande EP 0 633 317.

30 Selon la présente invention, le gène chimère peut également être associé à un marqueur de sélection adapté à l'organisme hôte transformé. De tels marqueurs de sélection sont bien connus de l'homme du métier. Il pourra s'agir d'un gène de résistance aux antibiotiques, ou encore un gène de tolérance aux herbicides pour les plantes.

La présente invention concerne également un vecteur de clonage ou d'expression pour la transformation d'un organisme hôte contenant au moins un gène chimère tel que défini ci-dessus. Ce vecteur comprend outre le gène chimère ci-dessus, au moins une origine de réPLICATION, et le cas échéant un marqueur de sélection approprié. Ce vecteur 5 peut être constitué par un plasmide, un cosmid, un bactériophage ou un virus, transformés par l'introduction du gène chimère selon l'invention. De tels vecteurs de transformation en fonction de l'organisme hôte à transformer sont bien connus de l'homme du métier et largement décrits dans la littérature.

Pour la transformation des cellules végétales ou des plantes, il s'agira notamment 10 d'un virus qui peut être employé pour la transformation des plantes développées et contenant en outre ses propres éléments de réPLICATION et d'expression. De manière préférentielle, le vecteur de transformation des cellules végétales ou des plantes selon l'invention est un plasmide.

L'invention a encore pour objet un procédé de transformation des organismes 15 hôtes, en particulier des cellules végétales par intégration d'au moins un fragment d'acide nucléique ou un gène chimère tels que définis ci-dessus, transformation qui peut être obtenue par tout moyen connu approprié, amplement décrit dans la littérature spécialisée et notamment les références citées dans la présente demande, plus particulièrement par le vecteur selon l'invention.

20 Une série de méthodes consiste à bombarder des cellules, des protoplastes ou des tissus avec des particules auxquelles sont accrochées les séquences d'ADN. Une autre série de méthodes consiste à utiliser comme moyen de transfert dans la plante un gène chimère inséré dans un plasmide Ti d'*Agrobacterium tumefaciens* ou Ri d'*Agrobacterium rhizogenes*.

25 D'autres méthodes peuvent être utilisées telles que la micro-injection ou l'électroporation, ou encore la précipitation directe au moyen de PEG.

L'homme du métier fera le choix de la méthode appropriée en fonction de la nature de l'organisme hôte, en particulier de la cellule végétale ou de la plante.

30 La présente invention a encore pour objet les organismes hôtes, en particulier cellules végétales ou plantes, transformés et contenant une quantité efficace d'un gène chimère comprenant une séquence codante pour l'androctonine définie ci-dessus.

La présente invention a encore pour objet les plantes contenant des cellules transformées, en particulier les plantes régénérées à partir des cellules transformées. La

régénération est obtenue par tout procédé approprié qui dépend de la nature de l'espèce, comme par exemple décrit dans les références ci-dessus.

Pour les procédés de transformation des cellules végétales et de régénération des plantes, on citera notamment les brevets et demandes de brevet suivants: US 4,459,355, 5 US 4,536,475, US 5,464,763, US 5,177,010, US 5,187,073, EP 267,159, EP 604 662, EP 672 752, US 4,945,050, US 5,036,006, US 5,100,792, US 5,371,014, US 5,478,744, US 5,179,022, US 5,565,346, US 5,484,956, US 5,508,468, US 5,538,877, US 5,554,798, US 5,489,520, US 5,510,318, US 5,204,253, US 5,405,765, EP 442 174, EP 486 233, EP 486 234, EP 539 563, EP 674 725, WO 91/02071 et WO 95/06128.

10 La présente invention concerne également les plantes transformées issues de la culture et/ou du croisement des plantes régénérées ci-dessus, ainsi que les graines de plantes transformées.

Les plantes ainsi transformées sont résistantes à certaines maladies, en particulier à certaines maladies fongiques ou bactériennes. De ce fait, la séquence d'ADN codant pour 15 l'androctonine peut être intégrée avec pour objectif principal la réalisation de plantes résistantes aux dites maladies, l'androctonine étant efficace contre des maladies fongiques telles que celles causées par *Cercospora*, en particulier *Cercospora beticola*, *Cladosporium* en particulier *Cladosporium herbarum*, *Fusarium*, en particulier *Fusarium culmorum* ou *Fusarium graminearum*, ou par *Phytophthora*, en particulier *Phytophthora 20 cinnamomi*.

Le gène chimère pourra également être associé, et de manière avantageuse, à au moins un marqueur de sélection, tel qu'un ou plusieurs gènes de tolérance aux herbicides.

La séquence d'ADN codant pour l'androctonine peut également être intégrée comme marqueur de sélection lors de la transformation de plantes avec d'autres séquences 25 codant pour d'autres peptides ou protéines d'intérêt, comme par exemple des gènes de tolérance aux herbicides.

De tels gènes de tolérance aux herbicides sont bien connus de l'homme du métier et notamment décrits dans les demandes de brevet EP 115 673, WO 87/04181, EP 337 899, WO 96/38567 ou WO 97/04103.

30 Bien entendu, les cellules et plantes transformées selon l'invention peuvent comprendre outre la séquence codant pour l'androctonine, d'autres séquences hétérologues codant pour des protéines d'intérêt comme d'autres peptides complémentaires susceptibles de conférer à la plante des résistances à d'autres maladies d'origine bactérienne ou

fongique, et/ou d'autres séquences codant pour des protéines de tolérance aux herbicides, notamment définies ci-dessus et/ou d'autres séquences codant pour des protéines de résistance aux insectes, comme les protéines *Bt* notamment.

Les autres séquences peuvent être intégrées au moyen du même vecteur  
5 comprenant le gène chimère selon l'invention, lequel comprend une séquence codant pour l'androctonine, et comprenant au moins un autre gène comprenant une autre séquence codant pour un autre peptide ou protéine d'intérêt.

Elles peuvent également être intégrées au moyen d'un autre vecteur comprenant au moins la dite autre séquence, selon les techniques usuelles définies ci-dessus.

10 Les plantes selon l'invention peuvent encore être obtenues par croisement de parents, l'un portant le gène selon l'invention codant pour l'androctonine, l'autre portant un gène codant pour au moins un autre peptide ou protéine d'intérêt.

15 Parmi les séquences codant pour d'autres peptides antifongiques, on peut citer celle codant pour la drosomicine, décrite dans la demande de brevet FR 2 725 992 et par Fehlbaum & coll. (1994), et dans la demande de brevet non publiée FR 97 09115 déposée le 24 juillet 1997.

20 La présente invention concerne enfin un procédé de culture des plantes transformées selon l'invention, le procédé consistant à planter les graines des dites plantes transformées dans une surface d'un milieu de culture, en particulier d'un champ, approprié pour la culture des dites plantes, à appliquer sur la dite surface une composition agrochimique, sans affecter de manière substantielle les dites graines ou les dites plantes transformées, puis à récolter les plantes cultivées lorsqu'elles arrivent à la maturité souhaitée et éventuellement à séparer les graines des plantes récoltées.

25 Par composition agrochimique, on entend selon l'invention toute composition agrochimique comprenant au moins un produit actif ayant l'une des activités suivantes, herbicide, fongicide, bactéricide, virucide ou insecticide.

30 Selon un mode préférentiel de réalisation du procédé de culture selon l'invention, la composition agrochimique comprend au moins un produit actif ayant au moins une activité fongicide et/ou bactéricide, plus préférentiellement présentant une activité complémentaire de celle de l'androctonine produite par les plantes transformées selon l'invention.

Par produit présentant une activité complémentaire de celle de l'androctonine, on entend selon l'invention un produit présentant un spectre d'activité complémentaire, c'est

à dire un produit qui sera actif contre des attaques de contaminants (champignons, bactéries ou virus) insensibles à l'androctonine, ou encore un produit dont le spectre d'activité recouvre celui de l'androctonine, totalement ou en partie, et dont la dose d'application sera diminuée de manière substantielle du fait de la présence de 5 l'androctonine produite par la plante transformée.

Enfin, la culture des organismes hôtes transformés permet de produire de l'androctonine à large échelle. La présente invention concerne donc également un procédé de préparation de l'androctonine, comprenant les étapes de culture de l'organisme hôte transformé comprenant un gène codant pour l'androctonine tel que défini ci-dessus dans 10 un milieu de culture approprié, puis l'extraction et la purification totale ou partielle de l'androctonine obtenue.

Les exemples ci-après permettent d'illustrer l'invention, la préparation de la séquence codant pour l'androctonine, du gène chimère, du vecteur d'intégration et des 15 plantes transformées. Les figures 1 à 5 en annexe décrivent les structures schématiques de certains plasmides préparés pour la construction des gènes chimères. Dans ces figures, les différents sites de restriction sont marqués en *italiques*.

#### Exemple 1: Construction des gènes chimères

Toutes les techniques employées ci-après sont des techniques standard de 20 laboratoire. Les protocoles détaillés de ces techniques sont notamment décrits dans Ausubel & coll.

#### pRPA-MD-P: Crédit d'un plasmide contenant le signal peptide du gène PR-1a du tabac.

25 Les deux oligonucléotides synthétiques complémentaires Oligo 1 et Oligo 2 ci-après, sont hybridés à 65 °C pendant 5 minutes puis par diminution lente de la température à 30°C pendant 30'.

Oligo 1: 5' GCGTCGACGC GATGGGTTTC GTGCTTTCT CTCAGCTTCC  
30 ATCTTCCCTT CTTGTGTCTA CTCTTCTTCT TTTCC 3'

Oligo 2: 5' TCGCCGGCAC GGCAAGAGTA AGAGATCACA AGGAAAAGAA  
GAAGAGTAGA CACAAGAAGG AAAGATGGAA GC 3'

Après hybridation entre l'Oligo 1 et l'Oligo 2, l'ADN resté simple brin sert de matrice au fragment klenow de la polymérase 1 de *E. coli* (dans les conditions standard préconisées par le fabriquant (New England Biolabs)) pour la création de l'oligonucléotide double brin à partir de l'extrémité 3' de chaque oligo. L'oligonucléotide double brin obtenu est ensuite digéré par les enzymes de restriction *SacII* et *NaeI* et cloné dans le plasmide pBS II SK(-) (Stratagene) digéré par les même enzymes de restriction. On obtient alors un clone comprenant la région codant pour peptide signal du gène PR-1a du tabac (SEQ ID NO 2).

10 **pRPA-PS-PR1a-andro:** Création d'une séquence codant pour l'androctonine fusionnée au signal peptide PR-1a sans région non transcrive en 3'.

Les deux oligonucléotides synthétiques complémentaires de séquences Oligo 3 et Oligo 4 selon les conditions opératoires décrites pour pRPA-MD-P.

15 Oligo 3: 5' AGGTCCGTGT GCAGGCAGAT CAAGATCTGC AGGAGGAGGG  
GTGG 3'  
Oligo 4: 5' CCGGATCCGT CGACACGTTT GCCTCGCCGA GCTCAGTATG  
GCCTGTTAGT GCACTTGAG TAGCAACCAC CCCTCCTCCT  
GCAGATCTTG ATCTGCC 3'

20 Après hybridation entre l'Oligo 3 et l'Oligo 4, l'ADN resté simple brin sert de matrice au fragment klenow de la polymérase 1 de *E. coli* (dans les conditions standard préconisées par le fabriquant (New England Biolabs)) pour la création de l'oligonucléotide double brin à partir de l'extrémité 3' de chaque oligo. Cet oligonucléotide double brin contenant la partie codante de l'androctonine (SEQ ID NO 1) est ensuite cloné directement dans le plasmide pRPA-MD-P qui a été digéré avec l'enzyme de restriction *NaeI*. L'orientation correcte du clone obtenu est vérifiée par séquençage. On obtient alors un clone comprenant la région codant pour la protéine de fusion PR-1a-androctonine située entre les sites de restriction *NcoI* à l'extrémité N-terminale et *ScalI*, *SacII* et *BamHI* à l'extrémité C-terminale (SEQ ID NO 3).

**pRPA-RD-238:** Création d'un vecteur d'expression dans les plantes comprenant la la séquence codant pour la protéine de fusion PR-1a-androctonine.

Le plasmide pRTL-2 GUS, dérivé du plasmide pUC-19, a été obtenu auprès du Dr.

Jim Carrington (Texas A&M University, non décrit). Ce plasmide dont la structure schématique est représentée sur la figure 1, contient le promoteur CaMV 35S dupliqué isolé du virus de la mosaïque du choux fleur (Promoteur CaMV 2x35S; Odell & coll., 1985) qui dirige l'expression d'un ARN contenant séquence non traduite en 5' du virus etch 5 du tabac (TEV 5' UTR; Carrington & Freed, 1990), le gène de la  $\beta$ -glucuronidase de *E. coli* (GUS Jefferson & coll., 1987) suivi du site de polyadenylation de l'ARN 35S de CaMV (CaMV polyA; Odell & coll., 1985).

Le plasmide pRTL-2 GUS est digéré avec les enzymes de restriction *NcoI* et *BamHI* et le grand fragment d'ADN est purifié. Le plasmide pRPA-PS-PR1a-andro est digéré avec les enzymes de restriction *NcoI* et *BamHI* et le petit fragment d'ADN contenant la région codant pour la protéine de fusion PR-1a-androctonine est purifié. Les deux fragments d'ADN purifiés sont ensuite liés ensemble dans une cassette d'expression dans les plantes qui synthétise une protéine de fusion PR-1a-androctonine. La structure schématique de cette cassette d'expression est représentée sur la figure 2. « PR-1a-androctonine » représente la région codante pour la protéine de fusion PR-1a-androctonine de pRPA-RD-230. L'androctonine est transportée vers la matrice extra-cellulaire de la plante par l'action du peptide signal PR-1a.

**pRPA-RD-195:** Création d'un plasmide contenant un site de clonage multiple modifié.

Le plasmide pRPA-RD-195 est un plasmide dérivé du pUC-19 qui contient un site de clonage multiple modifié. Les oligonucléotides synthétiques complémentaires Oligo 5 et Oligo 6 ci-après, sont hybridés et rendus double brin selon la procédure décrite pour pRPA-MD-P.

25

Oligo 5: 5' AGGGCCCCCT AGGGTTAAA CGGCCAGTCA GGCGAATTG  
          GAGCTCGGTA CCCGGGGATC CTCTAGAGTC GACCTGCAGG  
          CATGC 3'

Oligo 6: 5' CCCTGAACCA GGCTCGAGGG CGCGCCTTAA TTAAAAGCTT  
          GCATGCCTGC AGGTCGACTC TAGAGG 3'

L'oligonucléotide double brin obtenu est ensuite lié dans pUC-19 qui a été préalablement digéré avec les enzymes de restriction *EcoRI* et *HindIII* et rendu bouts

francs en employant le fragment klenow de l'ADN polymérase I de *E. coli*. On obtient un vecteur contenant de multiples sites de clonage pour faciliter l'introduction des cassettes d'expression dans un plasmide vecteur d'*Agrobacterium tumefaciens*. La structure schématique de ce site de clonage multiple est représentée sur la figure 3.

5

**pRPA-RD-233: Introduction de la cassette d'expression de PR-1a-androctonine de pRPA-RD-230 dans pRPA-RD-195.**

Le plasmide pRPA-RD-230 est digéré avec l'enzyme de restriction *HindIII*. Le fragment d'ADN contenant la cassette d'expression de PR-1a-androctonine est purifié. Le 10 fragment purifié est ensuite lié dans pRPA-RD-195 qui a été préalablement digéré avec l'enzyme de restriction *HindIII* et déphosphorylé avec la phosphatase intestinale de veau.

**pRPA-RD-174: Plasmide dérivé de pRPA-BL-150A (EP 0 508 909) contenant le gène de tolérance au bromoxynil de pRPA-BL-237 (EP 0 508 909).**

15 Le gène de tolérance au bromoxynil est isolé de pRPA-BL-237 par une amplification génique par PCR. Le fragment obtenu est à bouts francs et est cloné dans le site *EcoRI* de pRPA-BL-150A qui a été rendu bouts francs par l'action de la polymérase klenow dans des conditions standard. On obtient un vecteur d'*Agrobacterium tumefaciens* qui contient le gène de tolérance au bromoxynil à proximité de sa bordure droite, un gène 20 de tolérance à la kanamycine à proximité de sa bordure gauche et un site de clonage multiple entre ces deux gènes.

La structure schématique de pRPA-RD-174 est représentée sur la figure 4. Sur cette figure, "nos" représente le site de polyadenylation de la nopaline synthase d'*Agrobacterium tumefaciens* (Bevan & coll., 1983), "NOS pro" représente le promoteur 25 de la nopaline synthase d'*Agrobacterium tumefaciens* (Bevan & coll., 1983), "NPT II" représente le gène de la néomycine phosphotransphérase du transposon Tn5 de *E. coli* (Rothstein & coll., 1981), "35S pro" représente le promoteur 35S isolé du virus de la mosaïque du choux fleur (Odell & coll., 1985), "BRX" représente le gène de la nitrilase isolé de *K. ozaenae* (Stalker & coll., 1988), "RB" et "LB" représentent respectivement les 30 bordures droite et gauche de la séquence d'un plasmide Ti d'*Agrobacterium tumefaciens*.

**pRPA-RD-184: Addition d'un nouveau site de restriction, unique, dans pRPA-RD-174.**

Les oligonucléotides synthétiques complémentaires Oligo 7 et Oligo 8 ci-après, sont hybridés et rendus double brin selon la procédure décrite pour pRPA-MD-P.

5

Oligo 7: 5' CCGGCCAGTC AGGCCACACT TAATTAAGTT TAAACGCGGC  
CCCGGGCGCGC CTAGGTGTGT GCTCGAGGGC CCAACCTCAG  
TACCTGGTTC AGG 3'

10 Oligo 8: 5' CCGGCCTGAA CCAGGTACTG AGGTTGGGCC CTCGAGCACA  
CACCTAGGCG CGCCGGGGCC GCGTTAAC TTAATTAAGT  
GTGGCCTGAC TGG 3'

15 L'oligonucléotide double brin hybride (95 paires de bases) est purifié après séparation sur un gel d'agarose (3 % Nusieve, FMC). Le plasmide pRPA-RD-174 est digéré avec l'enzyme de restriction *Xma*I, et le grand fragment d'ADN est purifié. Les deux fragents d'ADN obtenus sont ensuite liés.

On obtient un plasmide dérivé de pRPA-RD-174 comprenant d'autres sites de restriction entre le gène de tolérance au bromoxynil et le gène de la kanamycine marqueur de sélection.

20 La structure schématique du plasmide pRPA-RD-184 est représentée sur la figure 5 où les termes "nos", "NPT II", "NOS pro", "35S pro", "BRX gene", "RB" et "LB" ont la même signification que pour la figure 4.

**pRPA-RD-236: Création d'un vecteur d'*Agrobacterium tumefaciens* contenant la construction du gène codant pour l'androctonine dirigée vers la matrice extracellulaire.**

La plasmide pRPA-RD-233 est digéré avec les enzymes de restriction *Pme*I et *Ascl* et le fragment d'ADN contenant le gène de PR-1a-androctonine est purifié. Le plasmide pRPA-RD-184 est digéré avec les même enzymes de restriction. Le fragment d'ADN 30 contenant la cassette d'expression de PR-1a-androctonine est ensuite liée dans pRPA-RD-184. On obtient ainsi un vecteur d'*Agrobacterium tumefaciens* contenant la séquence codant pour la protéine de fusion PR-1a-androctonine qui conduit à l'expression de l'androctonine dans la matrice extracellulaire de la plante.

**Exemple 2: Tolérance aux herbicides des tabacs transformés.****2.1- Transformation**

Le vecteur pRPA-RD-236 est introduit dans la souche *d'Agrobacterium tumefaciens* EHA101 (Hood & coll., 1987) porteuse du cosmid pTVK291 (Komari & coll., 1986). La technique de transformation est basée sur la procédure de Horsh & coll. (1985).

**2.2- Régénération**

La régénération du tabac PBD6 (provenance SEITA France) à partir d'explants foliaires est réalisée sur un milieu de base Murashige et Skoog (MS) comprenant 30 g/l de saccharose ainsi que 200 µg/ml de kanamycine. Les explants foliaires sont prélevés sur des plantes cultivées en serre ou *in vitro* et régénérées selon la technique des disques foliaires (Horsh & coll., 1985) en trois étapes successives: la première comprend l'induction des pousses sur un milieu additionné de 30 g/l de saccharose contenant 0,05 mg/l d'acide naphtylacétique (ANA) et 2 mg/l de benzylaminopurine (BAP) pendant 15 jours. Les pousses formées au cours de cette étape sont ensuite développées pendant 10 jours par culture sur un milieu MS additionné de 30 g/l de saccharose mais ne contenant pas d'hormone. Puis on prélève des pousses développées et on les cultive sur un milieu d'enracinement MS à teneur moitié en sels, vitamines et sucre et ne contenant pas d'hormone. Au bout d'environ 15 jours, les pousses enracinées sont passées en terre.

**2.3- Tolérance au bromoxynil**

Vingt plantes transformées ont été régénérées et passées en serre pour la construction pRPA-RD-236. Ces plantes ont été traitées en serre au stade 5 feuilles avec une suspension aqueuse de Pardner correspondant à 0,2 kg de matière active bromoxynil par hectare.

25

Toutes les plantes montrant une tolérance complète au bromoxynil sont ensuite employées dans différentes expérimentations qui montrent que l'expression de l'androctonine par les plantes transformées les rend résistantes aux agressions fongiques.

REFERENCES

- Ausubel, F. A. & coll. (eds. Greene). Current Protocols in Molecular Biology. Publ. Wiley & Sons.
- 5 Bevan, M. & coll. (1983). Nuc. Acids Res. **11**:369-385.
- Carrington and Freed (1990). J. Virol. **64**:1590-1597.
- Ehret-Sabatier & coll. (1996) The Journal of Biological Chemistry, **271**, **47**, 29537-29544.
- Horsch & coll. (1985). Science **227**:1229-1231.
- Jefferson & coll. (1987). EMBO J. **6**:3901-3907.
- 10 Komari & coll. (1986). J. Bacteriol. **166**:88-94.
- Rothstein & coll. (1981). Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. **45**: 99-105.
- Stalker & coll. (1988). J. Biol. Chem. **263**:6310-6314.
- Odell, J.T. & coll. (1985). Nature **313**:810-812.

REVENDICATIONS

1. Fragment d'acide nucléique, caractérisé en ce qu'il comprend une séquence d'acide nucléique codant pour une androctonine.

5 2. Fragment d'acide nucléique selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il s'agit d'une séquence d'ADN.

3. Fragment d'acide nucléique selon l'une des revendications 1 ou 2, caractérisé en ce que l'androctonine est constituée par un peptide pouvant être produit et isolé des scorpions, en particulier de l'espèce *Androctonus australis*, ledit peptide 10 comprenant au moins 20 acides aminés, de préférence au moins 25 acides aminés, et 4 résidus cystéine formant entre eux des ponts disulfure.

4. Fragment d'acide nucléique selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que l'androctonine comprend essentiellement la séquence peptidique de formule générale (I) suivante :

15 Xaa-Cys-Xab-Cys-Xac-Cys-Xad-Cys-Xae

(I)

dans laquelle

Xaa représente un reste peptidique comprenant au moins 1 acide aminé,

Xab représente un reste peptidique de 5 acides aminés,

20 Xac représente un reste peptidique de 5 acides aminés,

Xad représente un reste peptidique de 3 acides aminés, et

Xae représente un reste peptidique comprenant au moins 1 acide aminé.

5. Fragment d'acide nucléique selon la revendication 4, caractérisé en ce que Xab et/ou Xad et/ou Xae comprennent au moins un acide aminé basique.

25 6. Fragment d'acide nucléique selon la revendication 5, caractérisé en ce que les acides aminés basiques sont choisis parmi la lysine, l'asparagine ou l'homoasparagine.

7. Fragment d'acide nucléique selon l'une des revendications 4 à 6, caractérisé en ce que,

30 Xaa représente la séquence peptidique Xaa'-Val, dans laquelle Xaa' représente NH<sub>2</sub> ou un reste peptidique comprenant au moins 1 acide aminé, et/ou

Xab représente la séquence peptidique -Arg-Xab'-Ile, dans laquelle Xab' représente un reste peptidique de 3 acides aminés, et/ou

Xac représente la séquence peptidique -Arg-Xac'-Gly-, dans laquelle Xac' représente un

reste peptidique de 3 acides aminés, et/ou

Xad représente la séquence peptidique -Tyr-Xad'-Lys, dans laquelle Xad' représente un reste peptidique de 1 acide aminé, et/ou

Xae représente la séquence peptidique -Thr-Xae', dans laquelle Xae' représente COOH ou  
5 un reste peptidique comprenant au moins 1 acide aminé.

8. Fragment d'acide nucléique selon la revendication 7, caractérisé en ce que

Xaa' représente la séquence peptidique Arg-Ser-, et/ou

Xab' représente la séquence peptidique -Gln-Ile-Lys-, et/ou

Xac' représente la séquence peptidique -Arg-Arg-Gly-, et/ou

10 Xad' représente le reste peptidique -Tyr-, et/ou

Xae' représente la séquence peptidique -Asn-Arg-Pro-Tyr.

9. Fragment d'acide nucléique selon l'une des revendications 1 à 8, caractérisé en ce que l'androctonine est représentée par la séquence peptidique de 25 acides aminés décrite l'identificateur de séquence n° 1 (SEQ ID NO 1) et les séquences peptidiques  
15 homologues.

10. Fragment d'acide nucléique selon la revendication 9, caractérisé en ce qu'il est représenté par l'identificateur de séquence n° 1 (SEQ ID NO 1), une séquence homologue ou une séquence complémentaire de ladite séquence, plus particulièrement la partie codante de cette SEQ ID NO1, correspondant aux bases 1 à 75.

20 11. Fragment d'acide nucléique, caractérisé en ce qu'il comprend une séquence d'acide nucléique codant pour un peptide de fusion « peptide-androctonine » ou « androctonine-peptide », avantageusement « peptide-androctonine », l'androctonine étant définie selon l'une des revendications 1 à 9.

12. Fragment d'acide nucléique selon la revendication 11, caractérisé en ce que  
25 le peptide fusionné à l'androctonine est être un peptide signal ou un peptide de transit.

13. Fragment d'acide nucléique selon la revendication 12, caractérisé en ce que le peptide de transit est être un signal d'adressage chloroplastique ou mitochondrial.

14. Fragment d'acide nucléique selon la revendication 12, caractérisé en ce que le peptide signal est un signal N-terminal ou « prépeptide », éventuellement en association  
30 avec un signal responsable de la rétention de la protéine dans le réticulum endoplasmique, ou un peptide d'adressage vacuolaire ou « propeptide ».

15. Fragment d'acide nucléique selon la revendication 14, caractérisé en ce que le peptide signal est le peptide signal du gène PR-1 $\alpha$  du tabac.

16. Fragment d'acide nucléique selon la revendication 15, caractérisé en ce que le peptide de fusion « peptide-androctonine » est représenté par l'identificateur de séquence n° 3 (SEQ ID NO 3).

17. Fragment d'acide nucléique selon la revendication 16, caractérisé en ce que la séquence codante est représentée par l'identificateur de séquence n° 3 (SEQ ID NO 3), une séquence homologue ou une séquence complémentaire, plus particulièrement la partie codante de cette SEQ ID NO 3, correspondant aux bases 12 à 176 de cette séquence.

18. Protéine de fusion « peptide-androctonine » ou « androctonine-peptide », de préférence « peptide -androctonine », caractérisée en ce qu'elle est définie selon les revendications 11 à 16.

19. Gène chimère comprenant une séquence codante ainsi que des éléments de régulation en position 5' et 3' hétérologues pouvant fonctionner dans un organisme hôte, en particulier les cellules végétales ou les plantes, liés de manière fonctionnelle à ladite séquence codante, caractérisé en ce que ladite séquence codante comprend au moins un fragment d'ADN codant pour l'androctonine tel que défini selon les revendications 1 à 17.

20. Gène chimère selon la revendication 19, caractérisé en ce que l'organisme hôte est choisi parmi les bactéries, par exemple *E. coli*, les levures, en particulier des genres *Saccharomyces* ou *Kluyveromyces*, *Pichia*, les champignons, en particulier *Aspergillus*, d'un bacylovirus, et les cellules végétales et les plantes.

21. Gène chimère selon l'une des revendications 19 ou 20, caractérisé en ce qu'il est associé à un marqueur de sélection adapté à l'organisme hôte transformé.

22. Vecteur de clonage ou d'expression pour la transformation d'un organisme hôte caractérisé en ce qu'il comprend au moins un gène chimère tel que défini selon les revendications 19 à 21.

23. Procédé de transformation des organismes hôtes, en particulier des cellules végétales par intégration d'au moins un fragment d'acide nucléique ou un gène chimère tels que définis dans les revendications 19 à 21.

24. Procédé selon la revendication 23, caractérisé en ce que le gène chimère est intégré au moyen du vecteur selon la revendication 22.

25. Procédé selon l'une des revendications 23 ou 24, caractérisé en ce que l'organisme hôte est choisi parmi les bactéries, par exemple *E. coli*, les levures, en particulier des genres *Saccharomyces* ou *Kluyveromyces*, *Pichia*, les champignons, en particulier *Aspergillus*, d'un bacylovirus, et les cellules végétales et les plantes.

26. Procédé selon la revendication 25, caractérisé en ce que l'organisme hôte est une cellule végétale.

27. Procédé selon la revendication 26, caractérisé en ce que l'on régénère des plantes à partir des cellules végétales transformées.

5 28. Organisme hôte, en particulier cellule végétale ou plante, transformé caractérisé en ce qu'il comprend un gène chimère défini selon l'une des revendications 19 à 21.

10 29. Organisme hôte selon la revendication 28, caractérisé en ce qu'il est choisi parmi les bactéries, par exemple *E. coli*, les levures, en particulier des genres *Saccharomyces* ou *Kluyveromyces*, *Pichia*, les champignons, en particulier *Aspergillus*, d'un bacylovirus, et les cellules végétales et les plantes.

30. Plantes caractérisé en ce qu'elles comprennent des cellules végétales transformées selon la revendication 29.

15 31. Plante selon la revendication 30, caractérisé en ce qu'elle est régénérée à partir des cellules végétales transformées.

32. Plante, caractérisée en ce qu'elle est issues de la culture et/ou du croisement des plantes régénérées selon la revendication 31.

20 33. Plante selon l'une des revendications 30 à 32, caractérisée en ce qu'elle est choisie parmi le maïs, le blé, le colza, le soja, le riz, la canne à sucre, la betterave, le tabac et le coton.

25 34. Plante selon l'une des revendication 30 à 33, caractérisée en ce qu'elle est résistante aux maladies fongiques telles que celles causées par *Cercospora*, en particulier *Cercospora beticola*, *Cladosporium* en particulier *Cladosporium herbarum*, *Fusarium*, en particulier *Fusarium culmorum* ou *Fusarium graminearum*, ou par *Phytophthora*, en particulier *Phytophthora cinnamomi*.

35. Graines de plantes selon l'une des revendications 30 à 34.

30 36. Procédé de culture des plantes transformées selon l'une des revendications 30 à 34, ou obtenues par le procédé selon la revendication 27, le dit procédé consistant à planter les graines des dites plantes transformées dans une surface d'un milieu de culture, en particulier d'un champ, approprié pour la culture des dites plantes, à appliquer sur ladite surface une composition agrochimique, sans affecter de manière substantielle les dites graines ou les dites plantes transformées, puis à récolter les plantes cultivées lorsqu'elles arrivent à la maturité souhaitée et éventuellement à séparer les grains des plantes récoltées.

37. Procédé selon la revendication 36, caractérisé en ce que la composition agrochimique comprend au moins un produit actif ayant au moins une activité fongicide et/ou bactéricide.

5 38. Procédé selon la revendication 37, caractérisé en ce que le produit actif présente une activité complémentaire de celle de l'androctonine produite par les plantes transformées.

39. Procédé de préparation de l'androctonine définie selon l'une des revendications 1 à 18, comprenant les étapes de culture de l'organisme hôte transformé défini selon l'une des revendications 28 ou 29 dans un milieu de culture approprié, puis  
10 l'extraction et la purification totale ou partielle de l'androctonine obtenue.

1/2

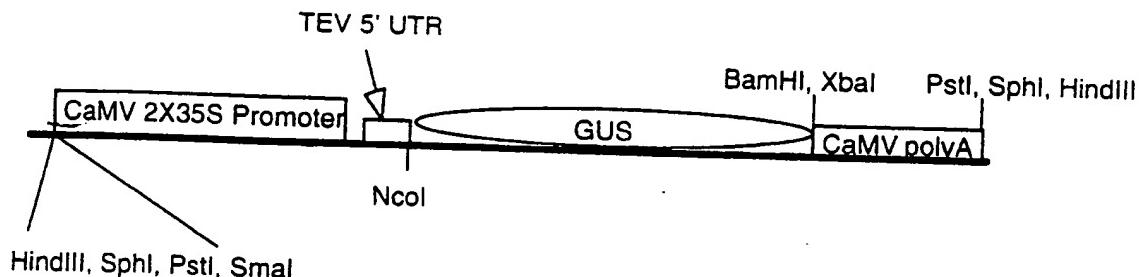


Fig. 1

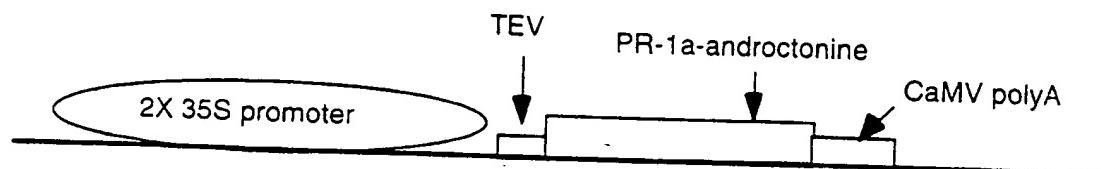


Fig. 2

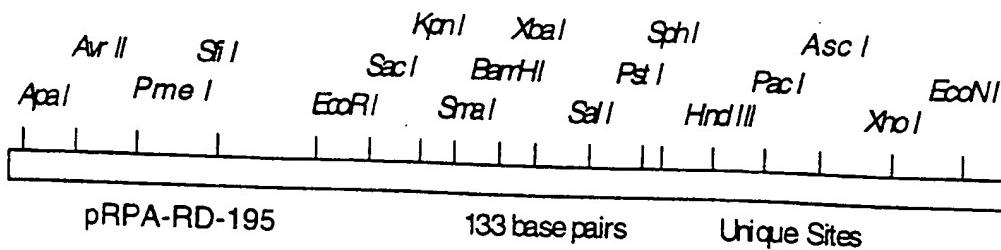


Fig. 3

2/2

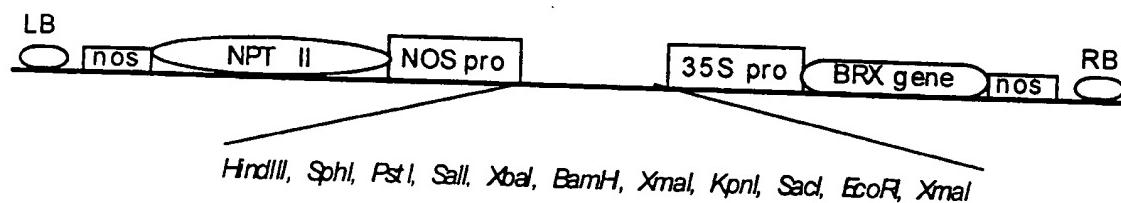


Fig. 4

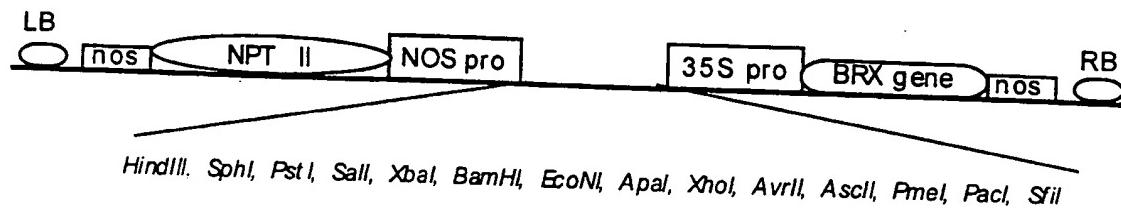


Fig. 5

## LISTE DE SEQUENCES

1

## (1) INFORMATIONS GENERALES:

## (i) DEPOSANT:

- (A) NOM: RHONE-POULENC AGROCHIMIE
- (B) RUE: 14-20 Rue Pierre BAIZET
- (C) VILLE: LYON
- (E) PAYS: France
- (F) CODE POSTAL: 69009

(ii) TITRE DE L'INVENTION: Gène codant pour l'androctonine, vecteur le contenant et plantes transformées obtenues résistantes aux maladies

(iii) NOMBRE DE SEQUENCES: 11

## (iv) FORME DECHIFFRABLE PAR ORDINATEUR:

- (A) TYPE DE SUPPORT: Floppy disk
- (B) ORDINATEUR: IBM PC compatible
- (C) SYSTEME D'EXPLOITATION: PC-DOS/MS-DOS
- (D) LOGICIEL: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (OEB)

## (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 1:

## (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 110 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: double
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN

## (ix) CARACTERISTIQUE:

- (A) NOM/CLE: CDS
- (B) EMPLACEMENT: 1..75

## (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 1:

AGG TCC GTG TGC AGG CAG ATC AAG ATC TGC AGG AGG AGG GGT GGT TGC  
 Arg Ser Val Cys Arg Gln Ile Lys Ile Cys Arg Arg Arg Gly Gly Cys  
 1 5 10 15

48

TAC TAC AAG TGC ACT AAC AGG CCA TAC TGAGCTCGGC GAGGCCAACG  
 Tyr Tyr Lys Cys Thr Asn Arg Pro Tyr  
 20 25

95

TGTCGACGGA TCCGG

110

## (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 2:

## (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 106 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: double
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN

(ix) CARACTERISTIQUE:

- (A) NOM/CLE: CDS
- (B) EMPLACEMENT: 12..101

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 2:

GCGTCGACGC C ATG GGT TTC GTG CTT TTC TCT CAG CTT CCA TCT TTC CTT Met Gly Phe Val Leu Phe Ser Gln Leu Pro Ser Phe Leu	50
1                   5                   10	
CTT GTG TCT ACT CTT CTT TTC CTT GTG ATC TCT CAC TCT TGC CGT Leu Val Ser Thr Leu Leu Phe Leu Val Ile Ser His Ser Cys Arg	98
15                 20                 25	

GCC GGCGA	106
Ala	
30	

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 3:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 211 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: double
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN

(ix) CARACTERISTIQUE:

- (A) NOM/CLE: CDS
- (B) EMPLACEMENT: 12..176

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 3:

GCGTCGACGC C ATG GGT TTC GTG CTT TTC TCT CAG CTT CCA TCT TTC CTT Met Gly Phe Val Leu Phe Ser Gln Leu Pro Ser Phe Leu	50
1                   5                   10	

CTT GTG TCT ACT CTT CTT TTC CTT GTG ATC TCT CAC TCT TGC CGT Leu Val Ser Thr Leu Leu Phe Leu Val Ile Ser His Ser Cys Arg	98
15                 20                 25	

GCC AGG TCC GTG TGC AGG CAG ATC AAG ATC TGC AGG AGG AGG GGT GGT Ala Arg Ser Val Cys Arg Gln Ile Lys Ile Cys Arg Arg Arg Gly Gly	146
30                 35                 40                 45	

TGC TAC TAC AAG TGC ACT AAC AGG CCA TAC TGAGCTGGC GAGGCGAACG Cys Tyr Tyr Lys Cys Thr Asn Arg Pro Tyr	196
50                 55	

TGTCGACGGA TCCGG	211

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 4:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
- (A) LONGUEUR: 75 paires de bases
  - (B) TYPE: nucléotide
  - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
  - (D) CONFIGURATION: linéaire

- (ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique
- (A) DESCRIPTION: /desc = "oligonucléotide synthétique 1"

- (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 4:

GCGTCGACGC GATGGGTTTC GTGCTTTCT CTCAGCTTCC ATCTTCCTT CTTGTGTCTA 60

CTCTTCTTCT TTTCC 75

- (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 5:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
- (A) LONGUEUR: 72 paires de bases
  - (B) TYPE: nucléotide
  - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
  - (D) CONFIGURATION: linéaire

- (ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique
- (A) DESCRIPTION: /desc = "oligonucléotide synthétique 2"

- (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 5:

TCGCCGGCAC GGCAAGAGTA AGAGATCACA AGGAAAAGAA GAAGAGTAGA CACAAGAAGG 60

AAAGATGGAA GC 72

- (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 6:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
- (A) LONGUEUR: 44 paires de bases
  - (B) TYPE: nucléotide
  - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
  - (D) CONFIGURATION: linéaire

- (ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique
- (A) DESCRIPTION: /desc = "oligonucléotide synthétique 3"

- (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 7:

AGGTCCGTGT GCAGGCAGAT CAAGATCTGC AGGAGGAGGG GTGG 44

- (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 7:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
- (A) LONGUEUR: 97 paires de bases
  - (B) TYPE: nucléotide
  - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
  - (D) CONFIGURATION: linéaire

- (ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique

(A) DESCRIPTION: /desc = "oligonucléotide synthétique 4"

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 7:

CCGGATCCGT CGACACGTTC GCCTGCCGA GCTCAGTATG GCCTGTTAGT GCACTTGTAG 60

TAGCAACCAC CCCTCCTCCT GCAGATCTTG ATCTGCC 97

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 8:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 85 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique

(A) DESCRIPTION: /desc = "oligonucléotide synthétique 5"

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 8:

AGGGCCCCCT AGGGTTTAAA CGGCCAGTCA GGCGAATTG GAGCTCGGTA CCCGGGGATC 60

CTCTAGAGTC GACCTGCAGG CATGC 85

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 9:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 66 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique

(A) DESCRIPTION: /desc = "oligonucléotide synthétique 6"

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 9:

CCCTGAACCA GGCTCGAGGG CGCGCCTTAA TTAAAGCTT GCATGCCTGC AGGTCGACTC 60

TAGAGG 66

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 10:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 93 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique

(A) DESCRIPTION: /desc = "oligonucléotide synthétique 7"

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 10:

CCGGCCAGTC AGGCCACACT TAATTAAGTT TAAACGCGGC CCCGGCGCGC CTAGGTGTGT 60

GCTCGAGGGC CCAACCTCAG TACCTGGTTC AGG

93

## (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 11:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:  
(A) LONGUEUR: 93 paires de bases  
(B) TYPE: nucléotide  
(C) NOMBRE DE BRINS: simple  
(D) CONFIGURATION: linéaire

- (ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique  
(A) DESCRIPTION: /desc = "oligonucléotide synthétique 8"

- (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 11:

CCGGCCTGAA CCAGGTACTG AGGTTGGGCC CTCGAGCACA CACCTAGGCG CGCCGGGCC

60

GCCTTTAAC TTAATTAAGT GTGGCCTGAC TGG

93

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inte: onal Application No  
PCT/FR 98/01814

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**  
IPC 6 C12N15/82 C07K14/435 C12N15/12 A01H1/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
IPC 6 C12N C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>L. EHRET-SABATIER ET AL.,:          "Characterization of novel cysteine-rich antimicrobial peptides from scorpion blood"          THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY,          vol. 271, no. 47, 1996, pages 29537-29544,          XP002060972          BETHESSDA, MD, US          cited in the application          see the whole document</p> <p>---</p> <p style="text-align: center;">-/--</p>	<p>1-8,          11-15,          18-21,          23-39</p>

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

\* Special categories of cited documents :

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- \*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- \*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- \*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- \*Z\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
14 December 1998	21/12/1998

Name and mailing address of the ISA  
 European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
 NL - 2280 HV Rijswijk  
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.  
 Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

MATEO ROSELL, A

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Inte	onal Application No
PCT/FR 98/01814	

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	EP 0 392 225 A (CIBA GEIGY AG) 17 October 1990  see abstract see page 5, line 5 - page 6, line 31; example 8 see page 23	1-8, 11-15, 18-21, 23-39
A	WO 95 19443 A (CIBA GEIGY AG) 20 July 1995 cited in the application see page 7, paragraph 3 - page 9, paragraph 2 see sequence 17, page 64-65 see page 41, paragraph 44 ---	12-17
A	WO 95 11305 A (ZENECA LTD) 27 April 1995 see the whole document ---	1-39
A	EP 0 508 909 A (RHONE POULENC AGROCHIMIE) 14 October 1992 cited in the application see the whole document ---	1,19, 22-33
A	A. DEE ET AL.: "Expression and secretion of a functional scorpion insecticidal toxin in cultured mouse cells" BIOTECHNOLOGY, vol. 8, no. 4, 1990, pages 339-342, XP000272753 NEW YORK, NY, US see the whole document ---	1-19,23
A	S. MAEDA ET AL.: "Insecticidal effects of an insect-specific neurotoxin expressed by a recombinant baculovirus" VIROLOGY, vol. 184, 1991, pages 777-780, XP000351799 SAN DIEGO, CA, US see the whole document ---	1-19,23
P,X	WO 97 30082 A (RHONE POULENC AGROCHIMIE) 21 August 1997 see the whole document ---	1-8,34

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

Inte	onal Application No
	PCT/FR 98/01814

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)		Publication date
EP 0392225	A	17-10-1990	AU	642865 B	04-11-1993
			AU	5218390 A	27-09-1990
			CA	2012778 A	24-09-1990
			JP	3035783 A	15-02-1991
			US	5614395 A	25-03-1997
			US	5654414 A	05-08-1997
			US	5689044 A	18-11-1997
			US	5650505 A	22-07-1997
			US	5804693 A	08-09-1998
			US	5789214 A	04-08-1998
			US	5777200 A	07-07-1998
			US	5767369 A	16-06-1998
-----					
WO 9519443	A	20-07-1995	US	5614395 A	25-03-1997
			AU	1249295 A	01-08-1995
			EP	0733117 A	25-09-1996
			US	5654414 A	05-08-1997
			US	5689044 A	18-11-1997
			US	5650505 A	22-07-1997
			US	5804693 A	08-09-1998
			US	5777200 A	07-07-1998
			US	5767369 A	16-06-1998
-----					
WO 9511305	A	27-04-1995	AU	7942394 A	08-05-1995
-----					
EP 0508909	A	14-10-1992	FR	2673643 A	11-09-1992
			AT	169338 T	15-08-1998
			AU	652610 B	01-09-1994
			AU	1144292 A	10-09-1992
			CA	2061636 A	06-09-1992
			DE	69226466 D	10-09-1998
			EP	0879891 A	25-11-1998
			ES	2118802 T	01-10-1998
			IL	101115 A	10-01-1997
			JP	5095789 A	20-04-1993
			MX	9200915 A	01-09-1992
			US	5510471 A	23-04-1996
			US	5633448 A	27-05-1997
-----					
WO 9730082	A	21-08-1997	FR	2745004 A	22-08-1997
			AU	1884397 A	02-09-1997
			EP	0882063 A	09-12-1998

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Document Internationale No  
PCT/FR 98/01814

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE  
CIB 6 C12N15/82 C07K14/435 C12N15/12 A01H1/00

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

## B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)  
CIB 6 C12N C07K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

## C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	L. EHRET-SABATIER ET AL.,: "Characterization of novel cysteine-rich antimicrobial peptides from scorpion blood" THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 271, no. 47, 1996, pages 29537-29544, XP002060972 BETHESDA, MD, US cité dans la demande voir le document en entier ---	1-8, 11-15, 18-21, 23-39

Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

### \* Catégories spéciales de documents cités:

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- "T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- "&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

14 décembre 1998

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

21/12/1998

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale  
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.  
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

MATEO ROSELL, A

**RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE**

Dernière Internationale No  
PCT/FR 98/01814

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	EP 0 392 225 A (CIBA GEIGY AG) 17 octobre 1990  voir abrégé voir page 5, ligne 5 – page 6, ligne 31; exemple 8 voir page 23  ---	1-8, 11-15, 18-21, 23-39
A	WO 95 19443 A (CIBA GEIGY AG) 20 juillet 1995 cité dans la demande voir page 7, alinéa 3 – page 9, alinéa 2 see sequence 17, page 64-65 voir page 41, alinéa 44  ---	12-17
A	WO 95 11305 A (ZENECA LTD) 27 avril 1995 voir le document en entier  ---	1-39
A	EP 0 508 909 A (RHONE POULENC AGROCHIMIE) 14 octobre 1992 cité dans la demande voir le document en entier  ---	1,19, 22-33
A	A. DEE ET AL.: "Expression and secretion of a functional scorpion insecticidal toxin in cultured mouse cells" BIOTECHNOLOGY, vol. 8, no. 4, 1990, pages 339-342, XP000272753 NEW YORK, NY, US voir le document en entier  ---	1-19,23
A	S. MAEDA ET AL.: "Insecticidal effects of an insect-specific neurotoxin expressed by a recombinant baculovirus" VIROLOGY, vol. 184, 1991, pages 777-780, XP000351799 SAN DIEGO, CA, US voir le document en entier  ---	1-19,23
P,X	WO 97 30082 A (RHONE POULENC AGROCHIMIE) 21 août 1997 voir le document en entier  ----	1-8,34

**RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE**

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Date Internationale No  
PCT/FR 98/01814

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
EP 0392225	A 17-10-1990	AU 642865 B AU 5218390 A CA 2012778 A JP 3035783 A US 5614395 A US 5654414 A US 5689044 A US 5650505 A US 5804693 A US 5789214 A US 5777200 A US 5767369 A	04-11-1993 27-09-1990 24-09-1990 15-02-1991 25-03-1997 05-08-1997 18-11-1997 22-07-1997 08-09-1998 04-08-1998 07-07-1998 16-06-1998
WO 9519443	A 20-07-1995	US 5614395 A AU 1249295 A EP 0733117 A US 5654414 A US 5689044 A US 5650505 A US 5804693 A US 5777200 A US 5767369 A	25-03-1997 01-08-1995 25-09-1996 05-08-1997 18-11-1997 22-07-1997 08-09-1998 07-07-1998 16-06-1998
WO 9511305	A 27-04-1995	AU 7942394 A	08-05-1995
EP 0508909	A 14-10-1992	FR 2673643 A AT 169338 T AU 652610 B AU 1144292 A CA 2061636 A DE 69226466 D EP 0879891 A ES 2118802 T IL 101115 A JP 5095789 A MX 9200915 A US 5510471 A US 5633448 A	11-09-1992 15-08-1998 01-09-1994 10-09-1992 06-09-1992 10-09-1998 25-11-1998 01-10-1998 10-01-1997 20-04-1993 01-09-1992 23-04-1996 27-05-1997
WO 9730082	A 21-08-1997	FR 2745004 A AU 1884397 A EP 0882063 A	22-08-1997 02-09-1997 09-12-1998